

ZUR ENZYMINDUKTION
BEI EXPERIMENTELLER
ALIMENTÄRER ZIRRHOSE DER RATTENLEBER
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE

Erika Trunk
geb. Landauer

1972

Aus der medizinischen Abteilung des städt. Krankenhauses

München Oberföhring

Chefarzt: Dr. E. Kautzsch

ZUR ENZYMINDUKTION BEI EXPERIMENTELLER

ALIMENTÄRER ZIRRHOSE DER RATTENLEBER

UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER

ALKALISCHEN PHOSPHATASE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer hohen medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Erika Trunk

geb. Landauer

aus München

1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

Berichterstatter:	Dr.E.Kautzsch
Mitberichterstatter:	Professor Dr.W.Seitz
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.3.1972



Für die Überlassung des Themas sowie für die mannigfachen Anregungen sage ich Herrn Chefarzt Dr. E. Kautzsch meinen Dank. Herrn Oberarzt Dr. O. Kunz danke ich für die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Zielsetzung	7
B. Schrifttum	
1. Enzymdarstellung und Verteilung der alkalischen Phosphatasen in der Leber des Menschen	7
2. Allgemeine Gesichtspunkte zur Enzymdarstellung in der Rattenleber	11
3. Allgemeine Gesichtspunkte zur diätetisch erzeugten Fettzirrhose bei der Ratte	13
C. Eigene Untersuchungen	
1. Methode	14
2. Ergebnisse	
a) Makroskopische Veränderungen	18
b) Histologische Veränderungen	20
c) Verhalten der Enzyme	22
D. Diskussion und Schlußfolgerung	28
E. Zusammenfassung	30
F. Literaturverzeichnis	32

A. Einleitung und Zielsetzung

Die Einbeziehung des Serumenzymusters in die Diagnostik hat in den vergangenen 15 - 20 Jahren zu wesentlichen Erkenntnissen beigetragen. Seit dieser Zeit befassen sich die Untersuchungen an Leberstanzzy lindern mit der routinemäßigen Erfassung der histochemischen Enzymdarstellung bei den verschiedenen Lebererkrankungen. In der Hämatologie wurden diesbezügliche Verfahren schon länger geübt. Mit der fortschreitenden Erforschung der Enzymreaktion wird oft auf tierexperimentelle Versuchsergebnisse hingewiesen. Es sollte mit dieser Arbeit verglichen werden, inwieweit Leberveränderungen der Ratte mit Veränderungen des menschlichen Organs übereinstimmen. Aus diesem Grunde wurde an Wistar-Ratten unter rein diätetischen Bedingungen versucht eine Leberzirrhose zu erzeugen, da unter zusätzlichen Noxen (z.B. Tetrachlorkohlenstoff, Äthionin etc.) von vornherein schon andere Kriterien für Veränderungen und Enzyminduktionen maßgebend sein dürften.

B. Schrifttum

1. Enzymdarstellung und Verteilung der alkalischen Phosphatasen in der Leber der Menschen.

Unter den Enzymen, die sich in der Leber histochemisch darstellen lassen, wurden die alkalischen Phosphatasen mit am häufigsten untersucht, denn sie waren die ersten Fermente, deren färbereischer Nachweis gelang (15). Trotzdem sind über die spezifische Wirkungsweise dieser Katalysatoren im Leberzellgefüge und über den Mechanismus seiner Elimination, die über die Gallenwege erfolgen soll (8), noch nicht alle Einzelheiten bekannt, obwohl speziell in der Leber die alkalischen Phosphatasen ihre vornehmliche Funktion in der Elimination von Substanzen aus der Leberzelle entfalten. Man erkennt heute auf Grund elektrophoretischer und immunologischer Trennverfahren mehrere organspezifische alkalische Phosphatasen als gesichert an. Im Serum finden sich zwei bis drei Arten, von denen eine nach dem Elektrophoresediagramm mit dem Enzym in der Galle identisch ist (18). Die Aktivität der alkalischen Gallenphosphatase geht mit derjenigen der alkalischen Serumphosphatase parallel. Darüber hinaus werden aber auch alkalische Phosphatasen im Leberparenchym selbst synthetisiert.

Hinsichtlich der allgemeinen Wirkungsweise der alkalischen Phosphatasen sei erwähnt, daß sie im alkalischen Milieu organisch gebundene Phosphorsäureester zu anorganischen Phosphaten umwandeln und Phosphat von einer Verbindung auf die andere übertragen. Sie spalten u.a. Saccharidphosphate, soweit diese als Monoester vorliegen.

Die klinisch empirische Enzymdiagnostik läßt bei Leberkrankheiten erkennen, daß die alkalischen Phosphatasen im Serum bei Leberkoma, portaler Encephalopathie, Metastasenleber, cholestatischer Hepatitis oder Hepatose, Verschlußikterus und manchmal in den ersten zwei Wochen der akuten Virushepatitis erhöht sind. In derartigen Fällen wird angenommen, daß ent-

weder die physiologische Elimination der aus dem Serum angebotenen alkalischen Phosphatasen gestört ist und auf diese Weise ein erhöhter Serumspiegel zustande kommt oder der erhöhte Serumspiegel wird über eine "de novo" Synthese des Enzyms in der Leber erreicht wie BIANCHI-BOSISIO (2) bei Ratten mit Gallengangsligaturen nachwies. Die Beurteilung der Enzymhistotopographie der Leber, wie sie im Stanzzyylinder ohne weiteres möglich ist, hat hingegen für klinische Zwecke bisher wenig Verwendung gefunden. Untersucher, die sich schon früh mit diesen Problemen beschäftigten - wobei allerdings vor allem Tierversuche und Einzelbeobachtungen im Vordergrund standen - haben den Veränderungen der Verteilung der alkalischen Phosphatase in Leberbiopsiepräparaten zunächst keinen diagnostischen Wert beigemessen (3).

Im Gegensatz zu dieser Auffassung zeigten Reihenuntersuchungen bei Hepatitis epidemica (9), daß ein Interesse an Beziehungen zwischen klinischen Verlaufsbildern und histochemisch darstellbaren Fermenten, insbesondere auch der alkalischen Phosphatasen, doch berechtigt ist. Als erstes darf herausgestellt werden, daß nach den o.g. Reihenuntersuchungen an Leberzyklindern von Menschen die Lokalisation der alkalischen Phosphatasen im histologischen Leberschnitt gewissen Gesetzmäßigkeiten folgt, die sich einerseits auf den parenchymalen, andererseits auf den mesenchymalen Anteil beziehen.

In der gesunden menschlichen Leber findet sich eine mäßige Aktivität in der Wandung der Sinusoide, sowohl im Läppchenzentrum als auch in der Peripherie, während die dazwischen liegenden Läppchenregionen keine Aktivität des Enzyms erkennen lassen. Der Bereich der Canaliculi, über die man sich die Elimination der Serumphosphatasen vorstellt, weist höchstens gelegentlich eine allenfalls angedeutete und disseminierte,

zumeist aber negative Fermentaktivität auf. Der zytoplasmatische Raum der Zelle und die Zellkerne einschließlich der Nucleoli sowie die periportalen Felder und die großen Gallengänge sind frei.

In bezug auf die spezielle Fragestellung zum Verhalten der alkalischen Phosphatasen im Verlaufe der Entwicklung einer experimentell erzeugten Fettzirrhose liegen bislang keine Ergebnisse vor.

War im menschlichen Leberpunktat im Verlaufe einer Hepatitis epidemica (9) eine Fibrose oder eine Destruktion der Glisson-Feldrandzonen mit Einbruch von Bindegewebe in das Läppchen zu erkennen, so kam nur in 10 % der Fälle eine normale Enzymverteilung, in 40 % eine mäßig verstärkte, aber in 50 % der Fälle eine sehr starke Enzymaktivität der alkalischen Phosphatasen zur Darstellung, die vor allem in den Sinuswandzellen, dann aber auch in Zellgruppen innerhalb der Periportalfelder ausgeprägt war. Es fand sich durchwegs eine erheblich verstärkte Enzymaktivität bei Übergang in eine chronische Form oder in eine floride Leberzirrhose. Es handelte sich tatsächlich um eine echte Zunahme des Enzyms, denn auch quantitativ wurde im Gewebshomogenat eine Mehrung des Fermentes nachgewiesen (20).

Die aktive chronische Hepatitis beim Menschen, noch mehr aber die floride Leberzirrhose weisen ganz regelmäßig eine erhöhte Enzymaktivität im Bereich der Canaliculi auf, die zudem bei der Leberzirrhose deformiert sind, d.h. sie stellen sich verbreitert und mit Schwankungen des Lumens dar (9).

Die Ursache der Vermehrung der alkalischen Leberphosphatasen ist letztlich unbekannt. Die Anwesenheit des Enzyms dürfte sich auf seine Funktion in der Elimination von Substanzen und im Zuckerabbau beziehen. Diese Möglichkeit gewinnt mit der Beobachtung an Wahrscheinlichkeit, daß die Aktivität des Enzyms in dem Ausmaße zunimmt, je deutlicher sich der

Krankheitsablauf dem chronischen Stadium zuwendet.

Die Frage nach dem Verhalten der alkalischen Phosphatasen in den Sinuswandzellen und zuweilen in den Canaliculi muß trotzdem letztlich noch unbeantwortet bleiben. Es ist bekannt, daß regenerierende Parenchymzellen besonders reich an alkalischen Phosphatasen sind (12, 21). Nachdem dieses Ferment in den Zuckerstoffwechsel eingreift und in der Regeneration der Energiebedarf groß ist, wäre eine Vermehrung der alkalischen Phosphatasen nicht nur in den Parenchymzellen sinnvoll, sondern gerade in den mesenchymalen Anteilen, die bei der Krankheitsabwehr eine besonders gesteigerte Aktivität aufweisen (9).

Die alkalischen Phosphatasen zeigen also die Aktivität einer Zirrhose an, wie Vergleichsuntersuchungen (10) über die Aktivität und Lokalisation der Enzyme bei der menschlichen Leberzirrhose zeigten. Mit zunehmender Aktivität einer Zirrhose steigt die Aktivität der Membranenzyme wie ATPase und alkalische Phosphatase in 80 - 95 % der Fälle an.

Wie die alkalischen Phosphatasen in den Sinusoiden ein Parameter im Verlauf einer Virushepatitis und chronischen Leberschädigung sind, so zeigt sich in 85 % einer Leberzirrhose eine Aufquellung der Canaliculi, während sie bei einer akuten Hepatitis und meist auch bei chronischen Lebererkrankungen, wenn sie nicht in eine Zirrhose übergehen, fehlt (10).

2. Allgemeine Gesichtspunkte zur Enzymdarstellung in der Rattenleber

Bisher genannte Parameter gelten ausschließlich für die menschliche Leberzirrhose. In bezug auf die Enzymverteilung in der Leber der Ratte sei auf Versuchsreihen hingewiesen(23),

bei denen Ratten mit karzinogenen Substanzen gefüttert wurden. Die Aktivität der alkalischen Phosphatasen in den Sinusoiden variierte beträchtlich, teilweise fehlte sie völlig. Auch in bezug auf die SuDH zeigte sich, daß bei diätetisch erzeugter Rattenlebernekrose die Aktivität fehlte, sobald die Zellen völlig nekrotisch waren (23).

In einer Versuchsreihe von POPPER et al. (17), bei der eine Leberzirrhose durch Fütterung von Äthionin bei Sprague-Dawley-Ratten erzeugt wurde und alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Glukose-6-Phosphatase, ATPase und SuDH beobachtet wurden, zeigten sich während der frühen Phasen der Äthioningaben keine bedeutenden Änderungen der Enzymaktivitäten in den Parenchymzellen. Die ATPase stieg jedoch in den Gallen-Canaliculi an. Saure Phosphatase und Esterase fanden sich in den Kupfferzellen etwas gesteigert gegenüber der Aktivität in ungeschädigten Leberzellen. Nachdem sich eine Zirrhose ausgebildet hatte, waren die Zellen, die die regenerierenden Leberläppchen enthielten, nicht von der normalen Leber zu unterscheiden, aber die zonale Verteilung, die für die meisten dieser Reaktionen charakteristisch ist, war gestört. Die alkalischen Phosphatasen fanden sich z.B. nur in unregelmäßiger Verteilung in den Gallengängen und Kapillaren. Auffallend war, daß durch Schädigung mit verschiedenen Noxen immer in den frühen Stadien der Leberschädigung (16, 17) die Veränderungen der Enzymaktivitäten eine empfindlichere Methode darstellen, um Zellschädigungen zu erkennen, als es histologische Methoden können. Vor allem wurden bei den experimentell erzeugten Leberschädigungen bei der Ratte die Aktivitäten der meisten Enzyme verringert, während die Aktivität der alkalischen Phosphatasen auffallenderweise meist gesteigert war.

Die Ursache wurde mit der Lokalisation der alkalischen Phosphatasen in den Canaliculi und Gallengängen zu erklären versucht, muß aber letztlich noch ungeklärt bleiben.

Schon diese Untersuchungen zeigen, daß sich die Enzymaktivitäten in der menschlichen Leber unter verschiedensten Bedingungen von Reaktionen der Rattenleber unterscheiden.

3. Allgemeine Gesichtspunkte zur diätetisch erzeugten Fettzirrhose bei der Ratte

Nun läßt sich im Tierexperiment z.B. durch Gabe hepatotoxischer Substanzen wie Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff usw. eine Leberzirrhose erzeugen. Auch - und darauf sei hier besondere Aufmerksamkeit gerichtet - allein durch eine bestimmte Diät ohne Zusatz schädlicher Noxen kann über eine Fettleber durch langfristige Fütterung bei Wistar-Ratten eine Leberzirrhose erzeugt werden. Eine rein diätetisch erzeugte Fettleber und Fettzirrhose wurde bei Ratten von einer Reihe von Autoren beschrieben (8, 9, 10, 13, 18). Dabei spielt vor allem ein Protein- und Cholinmangel im Futter eine bedeutende Rolle. Als sogen. lipotroper Faktor kann Cholin im Tierversuch eine Fettleber verhindern (6). Ein Eiweißmangel in der Nahrung führt zu einer massiven Fettablagerung in der Leberzelle, zu Leberfibrosen und -zirrhosen. Zusätzlich übermäßige Fettzufuhr beschleunigte die Leberzellverfettung. Auf Grund dieser Beobachtungen haben GYÖRGY und GOLDBLATT (6) eine protein- und cholinarme fettreiche Diät zur tierexperimentellen Erzeugung von Fett- und Zirrhoselebern bei Ratten vorgeschlagen. Ausgedehnte Untersuchungen haben dabei gezeigt, daß der Zusatz von Cystin die Bildung von Leber-

nekrosen mindert, jedoch die Entwicklung der Leberfibrose fördert. Auch der wöchentliche Zusatz von Vitamin E mindert diffuse Leberzellnekrosen. Schweineschmalz und Lebertran fördern die Entwicklung der Leberzirrhose. Beide Fette sind in dieser Hinsicht Butter und pflanzlichen Fetten überlegen.

C. Eigene Untersuchungen

Angeregt durch Untersuchungen von LINHART (14), der durch rein diätetische Maßnahmen ohne Zusatz von toxischen Substanzen einen Leberparenchymbau beschrieb, wurde der zeitliche Ablauf der Leberveränderungen und das Verhalten einiger Enzyme im Lebergewebe während der Entwicklung einer Leberzirrhose untersucht.

1. Methode

Es wurde eine Versuchsreihe von 70 männlichen und weiblichen Wistar-Ratten angesetzt, denen eine eiweißarme, fettreiche Diät nach AHLQUIST (1) verfüttert wurde.

Die Diät hatte folgende Zusammensetzung:

- 8 % Casein
- 18 % Saccharose
- 38 % Schweineschmalz
- 4 % einer Salzmischung
- 2 % Lebertran

Jedem Kilo dieser Diät wurden folgende Zusätze gemacht:

- 4,29 g Cystin
- 7,15 mg Thiaminhydrochlorid
- 14,6 mg Calciumpanthothinat

14,6 mg Nikotinsäure

2,93 mg Riboflavin

4,29 mg Pyridoxin

Jede Woche erhielt jede Ratte außerdem 5 mg Alpha-Tocopherol, da dies ebenso wie Cystin akute und massive Nekrosen verhindern soll (7).

Die Fütterung begann zunächst mit 60 Tieren die 1/2 Jahr alt waren und ein Ausgangsgewicht von ca. 480 g hatten. Nachdem sich im Verlauf der ersten Monate herausstellte, daß ein hoher Prozentsatz der Tiere wegen Überalterung und abszedierender Pneumonien die Fettfütterung nicht überlebte, wurde zusätzlich noch eine Kontrollserie mit 40 8 Wochen alten Tieren angesetzt, die ein Ausgangsgewicht von 250 bis 300 g hatten.

Zu Beginn der Versuchsreihe und dann jeweils nach einem, zwei, drei, fünf, sechs, acht und zehn Monaten wurden bei 4 - 5 Tieren in einer kurzen Äthernarkose Gewebsstückchen aus der Leber entnommen, anschließend wurden die Tiere getötet.

Die frisch entnommenen Gewebsstückchen wurden sofort tiefgefroren und die Schnittpräparate bei -20°C angefertigt, um die Aktivität der Gewebsenzyme möglichst rasch zu unterbrechen. Zu diesem Zwecke wurde ein kleines Stückchen rohes Kalbfleisch oder Rindfleisch auf dem Mikrotomtisch aufgefroren und der Objektträger bis zum Gebrauch in eine Blechhülle, wie sie als Kleinfilmdosen benutzt werden, gebracht und im Kohlensäureschnee in einem Thermosbehälter aufbewahrt.

Das Lebergewebsstückchen im Ausmaß von ca. 2 x 4 mm wurde sofort nach der Entnahme auf das tiefgefrorene Fleischstückchen gelegt, fror dort fest und verblieb bis zur weiteren Bearbeitung im Thermosbehälter. Der nächste Arbeitsgang erfolgte in üblicher Weise im Kryostaten (Kryostat "Dittes", Heidelberg). Routinemäßig wurden 10 Schnitte von 12 μ Dicke angefertigt. Zunächst wurden HE (Hämatoxylin-Eosin)-, Sudan- und die Berlinerblaufärbung angefertigt, das HE-Präparat wurde zur Darstellung des Kollagens auch in UV-Licht-Betrachtung ausgewertet. Durch die Einbeziehung enzymhistotopographischer Darstellungen des Lebergewebes gelingt es, gleichzeitig die Morphologie zu erfassen und über den Rahmen üblicher histologischer Gewebedarstellungen hinaus auch Aufschlüsse über die Funktion der Organellenstruktur der Leberzelle zu erfassen. Als Indikatorenzyme boten sich für die vergleichenden Untersuchungen folgende Enzyme an, die auch routinemäßig zur Darstellung kamen:

1. Die Adenosintriphosphatase (ATPase) und die alkalische Phosphatase (APh) als Membranenzyme. Erstere aktiviert die Spaltung des End-Phosphates vom ATP mit Freisetzung erheblicher Energie; letztere aktiviert die Phosphatübertragung und die Eliminierung von Substanzen aus der Leberzelle.
2. Die Succinodehydrogenase (SuDH) und die Glutamatdehydrogenase (GluDH) in den Mitochondrien als Katalysatoren im Krebszyklus und in der Atemkette sowie im Transaminierungssystem.
3. Die Lactatdehydrogenase (LDH) ein Cytoplasmaenzym, als Katalysator der Glykolyse bzw. der Pyruvatsynthese aus Milchsäure.

4. Die saure Phosphatase (SPh) in den Lysosomen, die als Hydrolase die intralysosomale Verdauung aktiviert. Es handelt sich also um Hauptkettenenzyme, deren generelle Verteilung im Gefüge der Einzelzelle weitgehend der Verteilung im menschlichen Lebergewebe entspricht.

In der Methodik der Darstellung sei anschließend die alkalische Gewebsphosphatase herausgegriffen, die übrigen Enzyme wurden nach ähnlichen Verfahren dargestellt. Das Verfahren bezieht sich ausschließlich auf Lebergewebe und erfordert bei anderen Organen geringe Abänderungen.

1. Die 12 μ dicken Schnitte werden im Kryostat auf Glasobjektträger ausgebreitet,
2. bei +4°C 30 Minuten lang in 4-%iger Formollösung fixiert,
3. ohne abzuspülen in folgendes Medium verbracht:
 - a) 10 ml 2-%iges Natrium- β -Glyzerophosphat
 - b) 10 ml 2-%iges Natrium-diäthylbarbiturat
 - c) 20 ml Aqua dest.
 - d) 2 ml 2-%ige Kalzium-Chloridlösung
 - e) 1 ml 2-%ige Magnesiumsulfatlösung(a, b, c sind jedesmal vor Gebrauch frisch herzustellen, d und e sind haltbare Lösungen).

Das Medium muß jedesmal neu angesetzt werden und hat ein pH 9. 60 Minuten lang erfolgt die Inkubation bei 37°C, anschließend werden die Präparate

4. 4 Minuten in fließendem Aqua dest. gewaschen,
5. 4 Minuten in 2-%iger Kobaltazetat-Lösung verbracht,
6. 3 mal mit Aqua dest. überschichtet und abgespült,
7. 1 - 2 Minuten läßt man gelbe Ammoniumsulfid-Lösung (1:40 Aqua dest.) einwirken,
8. dann wird in Leitungswasser gewässert.

9. 8 Minuten lang wird die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer angesetzt:
2,0 g Hämatoxylin in 2 000 ml Aqua dest.
0,4 g Natriumjodat
100 g Kali-Alaun
100 g Chloralhydrat
2,0 g Acid. citricum
werden nacheinander in der Hämatoxylin-Lösung aufgelöst. Die Lösung ist sofort verwendbar.
10. Etwa 10 Minuten wird in Brunnenwasser "geblaut", es erfolgt die Kontrolle des Optimums unter dem Mikroskop.
11. Nach Eintauchen des Präparates in Lösungen der aufsteigenden Alkoholreihe (70-%ig - 96-%ig) je ca. 1 Minute, dann ca. 2 Minuten in Isopropylalkohol und ca. 2 Minuten in Xylol
12. erfolgt der Einschuß mit Deckgläschen in Eukitt.

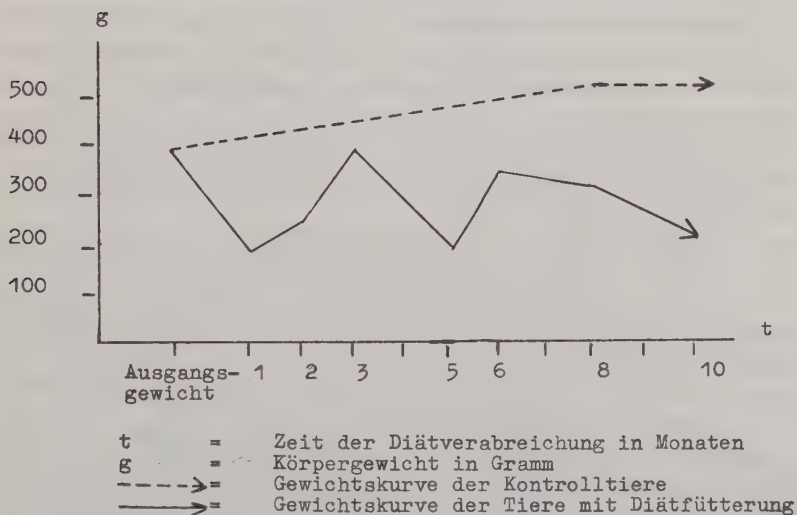
2. Ergebnisse

a) Makroskopische Veränderungen

Aussehen der Tiere: Im Laufe der Diätstudie wurde das Haar-
kleid der Tiere, besonders an Schnauze und Nacken, dünner und
struppig und bekam bereits ab 2. Monat einen gelblichen Farb-
ton. Vielfach kam es bereits nach 9 Wochen zu einem Schwund
des Unterhautfettgewebes und des retroperitonealen Fettes
und im Bereich der Schnauzen wurde eine rissige Schleimhaut
beobachtet.

Körpergewicht: Von einem Ausgangswert von ca. 480 g (1. Fett-
fütterung) und 300 g (2. Fettfütterung) fiel das Durchschnitts-
gewicht am stärksten in den ersten Monaten der Versuchsreihe.

Tab. 1 Gewichtsänderung der Tiere im Verlaufe der Versuchsreihe



Die Doppelgipfligkeit der Kurve (Tab. 1) ist durch verschiedene Ausgangsgewichte zu erklären, die sich vor allem im 5. Monat bemerkbar machten, da hier nur noch Wistar-Ratten der 2. Fettfütterung überlebten, die von vornherein ein kleineres Ausgangsgewicht hatten. Bei den Kontrolltieren aus der 1. und 2. Fettfütterung, die nach 8 und 10 Monaten getötet wurden, war sogar eine Gewichtszunahme von 120 g zu verzeichnen. Das Anfangsgewicht wurde bei allen Tieren, die mit obeng. Diät gefüttert worden waren, nicht mehr erreicht.

Leber: Makroskopisch ließ sich bei den Tieren eine Fettleber im 2. und 3. Monat bereits an der Gelbfärbung und teilweise bis 2-fachen Organvergrößerung erkennen, ab 5. Monat trat eine Felerung der Oberfläche der Leber wie bei

einer Zirrhoseleber auf. Eine vermehrte Ascitesbildung wurde als häufiges Begleitsymptom der sogen. Leberzirrhose beobachtet.

b) Histologische Veränderungen

Die histologischen Veränderungen begannen bei den Tieren der Fettfütterung mit einer großtropfigen unregelmäßigen und geringen Verfettung im 1. Monat, die im 2. Monat in eine diffuse grobtropfige Verfettung überging. In den Periportalfeldern und im Läppcheninneren traten nach 2 Monaten vereinzelt Rundzellinfiltrate auf.

Den 3. Monat der Fettdiät kennzeichnete eine diffuse, jetzt schon stärker ausgeprägte Leberzellverfettung (ca. 50 bis 75 %) mit Einzelzellnekrosen, die aber nur undeutlich Kollapsstraßen erkennen ließen.

Im 5. und 6. Monat der Diätstudie zeigten sich zu einer Verfettung von 75 % im HE-Präparat netzförmige Fibrosen und Septenbildungen, die aber im UV-Licht keine Bindegewebsfluoreszenz erkennen ließen. Die Nekrosebezirke waren in diesem Stadium stärker ausgeprägt. Es traten entzündliche Infiltrate mit vorwiegend Rundzellen, aber auch segmentkernigen und eosinophilen Leukozyten auf. In einzelnen Schnittpräparaten war eine deutliche Felderung, ähnlich einem sogen. zirrhotischem "Umbau" mit Bildung von sogen. "Pseudolobuli" zu erkennen (Abb. 1).

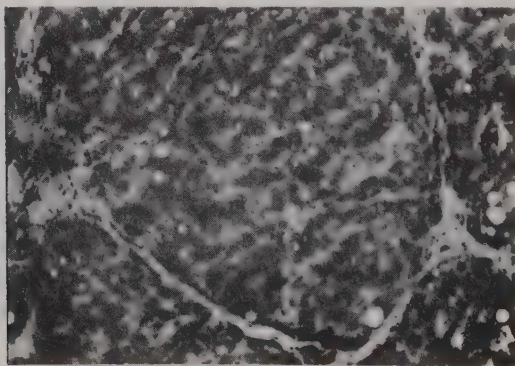


Abb. 1 Sogenannter Pseudolobulus mit verfetteten Parenchymbezirken (HE-Färbung, Vergrößerung 400-fach, 6. Monat der Fettfütterung).

Im 7. bis 10. Monat der Fettdiät war keine wesentliche Zunahme im Vergleich zum 5. und 6. Monat in bezug auf Ausbildung von sogen. Pseudolobuli mit Kollapsstraßen und Kernpolymorphie festzustellen, die Verfettung hatte aber einen durchschnittlichen Grad von 80 % erreicht.

Zur allgemeinen Histologie der Rattenleber sei gesagt, daß innerhalb der Lobuli Leberzellverbände sowie Sinusoide von der Peripherie konfluierend zur Zentralvene gehen, deren Durchmesser in ihrem weiteren Verlauf zur Basis der Lobuli ständig zunimmt. Das Parenchym der Leber besteht aus den Leberzellen, zwischen deren Verband die vorher genannten Sinusoide liegen. Das Bindegewebe der Rattenleber befindet sich allgemein schon ohne diätetisch erzeugte Veränderungen hauptsächlich interlobulär und zwar meistens rings um die portale Triade, die aus Vena porta, Art. hepatica und Gallengang besteht. Im periportalen Bindegewebe kommen relativ oft schon bei der gesunden Ratte kleine Herde von Rundzellen vor. Diese Zellen sind im allgemeinen lymphoide Zellen, die dem lymphatischen Gewebe angehören. Falls sich leukozytäre Elemente daneben finden, liegt wie behauptet wird (19) bereits ein pathologischer Zustand vor. Erwähnenswert sei vor allem, daß sich bei der gesunden Ratte histologisch normalerweise kein Bindegewebe nachweisen läßt. Trotzdem lassen sich die Lobuli bei den Tieren während gewisser pathologischer Zustände, z.B. perilobulärer bzw. zentrolobulärer Verfettung und bei Blutstauungen ziemlich deutlich wahrnehmen. Beachtenswert ist bei der Rattenleber, daß die fibrotischen Veränderungen nicht in den Portalfeldern wie bei der Leber des Menschen beginnen, sondern nahe der Zentralvene, obgleich sie nicht genau und ausschließlich perizentral gelegen sind wie z.B. bei der "Cirrhose cardiaque" des Menschen.

Ab 5. Monat wurde das Vorkommen eines goldenbraunen fluoreszierenden Pigments, das von LILLIE (6) und seinen Mitarbeitern "Ceroid" genannt wird und wiederholt in charakteristisch experimentell diätetisch erzeugten Leberzirrhosen bei Ratten beschrieben wurde, die regelmäßig mit Schweineschmalz als Fettquelle gefüttert worden waren, registriert.

Im Verlaufe der Versuchsreihe war eine vermehrte Eiseneinlagerung vereinzelt in Sternzellen und Hepatozyten nur einmal im 3. Monat und nach 5 Monaten kurzfristig aufgetreten. Nachdem sich gleichzeitig erstmals zu diesem Zeitpunkt sogen. Kollapsstraßen darstellen ließen, könnte die Eiseneinlagerung zu dieser Zeit als Nekroseisen interpretiert werden. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte während der Untersuchungsreihe keine vermehrte Eiseneinlagerung mehr nachgewiesen werden.

c) Verhalten der Enzyme
(siehe auch Tab. 2)

Alkalische Leberphosphatasen: Die normale Rattenleber zeigt keine Aktivität der alkalischen Phosphatasen, sie treten bei der Kontrollserie zu Beginn der Versuchsreihe nur vereinzelt diffus in wenigen Zellgrenzstrukturen auf (Abb. 2).

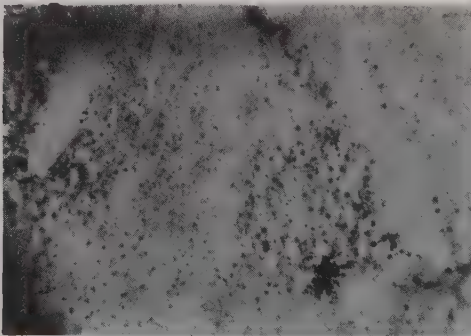


Abb. 2 Normale Verteilung und fast keine Aktivität von alkalischen Phosphatasen in der Leber der Wistar-Ratte. Vereinzelt diffuse Darstellung in wenigen

Zellgrenzstrukturen (Nachweis von alkalischen Phosphatasen, Vergrößerung 160-fach, Kontrollserie der ersten Versuchsreihe Wistar-Ratten vor Beginn der Fettfütterung)

Nach 2 Monaten zeigt sich eine geringgradige Steigerung der Aktivität ohne bestimmte Lokalisation mit diffuser Einsprossung vereinzelt von einigen Winkeln der Sinusoide in die Umgebung (Abb. 3).

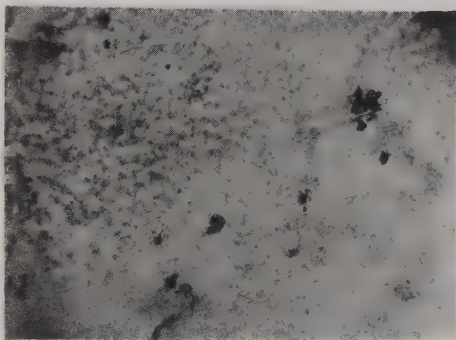


Abb. 3 Geringgradige vermehrte Aktivität der alkalischen Leberphosphatasen mit diffuser Einsprossung von einigen Winkeln der Sinusoide in die Umgebung (Nachweis von alkalischen Phosphatasen, Vergrößerung 160-fach, Ende des 2. Monats der Fettfütterung).

Erst im 3. Monat stellte sich eine deutlich gesteigerte Aktivität in Form von spinnenförmiger Einsprossung vom Parenchym in die Umgebung und diffuser Lokalisation ohne bestimmte Gesetzmäßigkeiten dar (Abb. 4).

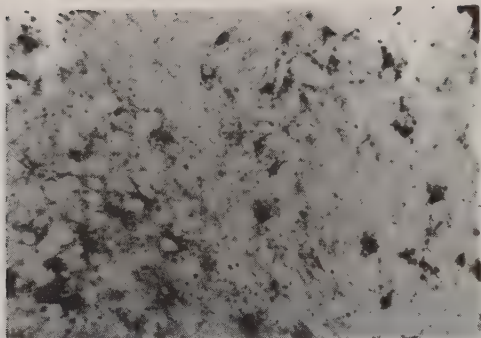


Abb. 4 Deutlich gesteigerte Aktivität der alkalischen Leberphosphatasen, diffuse Verteilung und spinnenförmige Einsprossung in die Umgebung (Nachweis von alkalischen Phosphatasen, Vergrößerung 400-fach, Ende des 3. Monats der Fettfütterung).

Dieser Prozeß verdeutlichte sich noch bis zum 5. Monat, es war nur ganz flüchtig bis zum 5. Monat eine gesteigerte Aktivität in den sogen. Nekrosen und Kollapsstraßen aufgetreten, ebenso eine geringgradig gesteigerte Aktivität in den Grenzstrukturen der Gefäße (Abb. 5)

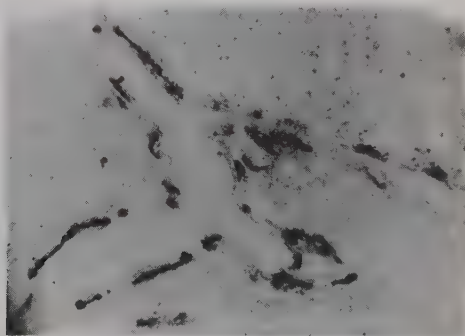


Abb. 5 Gesteigerte Aktivität der alkalischen Leberphosphatasen in den Grenzstrukturen der Gefäße (Nachweis von alkalischen Phosphatasen, Vergrößerung 400-fach, Ende des 5. Monats der Fettfütterung)

Tabelle 2

Strukturumbau und Aktivität der alkalischen Phosphatase
unter 10-monatiger Diätverabreichung

Diätverabreichung nach Monaten	HE Färbung	Fett-Färbung	Enzymdarstellung der alkalischen Phosphatase
5 Ratten vor Be- ginn der Diät	Struktur des Lebergewebes unauffällig	Keine Fettin- filtration	Keine Darstellung von Aktivität der alkalischen Phosphatase
4 Ratten nach <u>1 Monat</u> unter Diätverabreichung	bei allen Tieren Lebergewebe- struktur er- halten	bei 2 bereits feintropfige Fetteinlage- rung, bei 2 keine Fettein- lagerung	Keine vermehrte Aktivität der alkalischen Phosphatase
4 Ratten nach <u>2 Monaten</u>	bei allen Tieren Struktur des Lebergewebes erhalten	bei 2 Tieren 25 %, bei 2 Tieren 50 % Fetteinlage- rung	geringgradig ge- steigerte Aktivi- tät
4 Ratten nach <u>3 Monaten</u>	Beginn des Strukturum- baus	75 % Fett- einlagerung bei allen Tieren	vereinzelte Ein- sprossung in die Umgebung, bei allen Tieren ge- steigerte Akti- vität
2 Ratten nach <u>5 Monaten</u>	Bildung von sogen. Pseudolobuli	50 % - 75 % Fett- einlagerung	deutlich ge- steigerte Aktivität
4 Ratten nach <u>6 Monaten</u>	Bildung von sogen. Pseudolobuli	50 % - 75 % Fett- einlagerung	nur mäßig diffuse Aktivität
4 Ratten nach <u>8 Monaten</u>	sogen. Pseudolobuli	75 % Fettein- lagerung	nur vereinzelt diffus gesteigerte Aktivität
8 Ratten nach <u>10 Monaten</u>	noch deut- liche Pseudolobuli- bildung	75 % Fettein- lagerung	nur vereinzelt diffus gestei- gerte Aktivität
4 Kontrolltiere nach 8 und 10 Mo- naten ohne Diät- verabreichung	ursprüngliche Struktur des Lebergewebes erhalten	keine Fett- einlagerung	fast keine Ak- tivität kommt zur Darstellung

Nach 6, 8 und 10 Monaten zeigte sich eine deutliche Verminderung der Aktivität der alkalischen Phosphatasen, vereinzelt fand sich eine diffuse Darstellung entlang der Ceroid-Zonen. Gelegentlich trat sie in Spuren entlang der Kollapsstraßen auf, bestimmte Gesetzmäßigkeiten oder eine konstante gleichmäßige Anordnung konnte nicht gefunden werden. Spinnenartige Einsprossungen traten nicht mehr auf, wobei die HE-Präparate nach dieser Zeit eine gewisse Färbung haben erkennen lassen, die als pseudolobulärer Umbau gedeutet wurde.

Das Enzymverhalten läßt annehmen, daß nur im Verlaufe der aktiven Umbauvorgänge eine Enzyminduktion stattfindet, die sistiert wenn das Vollbild - hier der Leberzirrhose - erreicht ist.

Insofern besteht eine gewisse Parallelität zur menschlichen Leber, die bei florider Zirrhose eine beträchtliche Aktivität der alkalischen Phosphatasen aufweist, während die stationäre Zirrhose das gegenteilige Verhalten zeigt.

SuDH, GluDH, LDH, ATPasen und saure Phosphatasen: Es zeigte sich keine wesentliche Aktivitätsänderung im Verlaufe der Versuchsreihe, nur die GluDH zeigte anfangs eine geringstgradige Steigerung der Aktivität. Auch die ATPase war unauffällig gleichmäßig verteilt, ebenso fanden sich die sauren Phosphatasen in gleichmäßig pericanaliculärer Anordnung ohne Aktivitätssteigerung (siehe Tab. 3).

Enzymaktivität der SuDH, GluDH, LDH, ATPasen und sauren Phosphatase während der 10-monatigen Diätverabreichung

	Zeit nach Monaten	SuDH	GluDH	LDH	ATPasen	SrePH
unter Diätverabreichung	1. Monat	n	g	n	n	c
	2. Monat	n	g	n	n	c
	3. Monat	n	g	n	n	c
	5. Monat	n	g	n	n	c
	6. Monat	n	g	n	n	c
	8. Monat	n	g	n	n	c
	10. Monat	n	g	n	n	c
ohne Diät	10. Monat	g	g	n	n	c

Tabelle 3

- n = mäßig dichte gleichmäßige Verteilung
 g = gleichmäßig hohe Aktivität
 c = gleichmäßige Verteilung pericanaliculär

D. Diskussion und Schlußfolgerung

Bei der Wistar-Ratte entwickelte sich unter der beschriebenen Diätfütterung und ohne Zusatz von weiteren Lebernoxen am augenfälligsten in erster Linie eine Fettleber, wobei im Vergleich zum Menschen oder anderen Rattenstämmen die Ausbildung einer Fettzirrhose nicht zu beobachten war. So fehlte z.B. nachweislich der bindegewebige Umbau des Leberparenchyms, obwohl im HE- und im Sudanschnitt nach der Struktur des Lebergewebes durchaus der Eindruck entstehen konnte, daß sich pseudolubuläre Strukturen entwickeln.

Zusätzlich fehlte die zelluläre Infiltration im Bindegewebsanteil und wie es auch bei der menschlichen Fettzirrhose der Fall ist die Steigerung der Aktivität der alkalischen Phosphatasen in den Sinusoiden und anderen bindegewebigen Grenzstrukturen.

In bezug auf die fleckförmigen Nekrosen ist ein Vergleich mit der menschlichen Leberhistologie gleichfalls interessant: Bei den Nekrosen in der Leber der Wistar-Ratte war als auffallendster Befund ein positiver Siderinnachweis und die Lokalisation entlang der Kollapsstraßen zu sehen. Es fehlten eine eindeutige Reduktion der Dehydrogenasen-Aktivität (LDH, SuDH, GluDH) und eine deutliche Aktivierung der ATPasen und der sauren Phosphatase. Diese Veränderungen sind somit nicht vergleichbar mit den Flecknekrosen der Virushepatitis, die durch Abnahme der Aktivität an Dehydrogenasen, durch die positive Darstellung der sauren Phosphatase sowie im gleichfalls positiven Nachweis der ATPasen und je nach Stadium auch durch den Nachweis von diffusen Eisen in den Flecknekrosen dargestellt wird - sowie durch

die nahezu typischen entzündlichen Komponenten im Mesenchym gekennzeichnet ist. Nekrosen toxischer Art beim Menschen sind von denen bei Virushepatitis anhand der Änderungen der Enzymaktivitäten und des positiven Siderinnachweises nicht zu unterscheiden, hier fehlen jedoch die entzündliche Begleitreaktion in den Glissonfeldern der Leber. Die "piecemeal" Nekrosen bei chronisch aggressiver Hepatitis sind im Vergleich zu den Nekrosen bei der Virushepatitis durch die fehlende Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatasen und der ATPasen, bei Reduktion der Aktivität der Dehydrogenasen unterscheidbar, darüber hinaus durch die hochgradige Aktivitätssteigerung der alkalischen Phosphatasen und der ATPasen in Verbindung mit den Rundzellinfiltraten der Glissonfelder.

Wie anfangs unter Punkt B. bereits angeführt, ist beim Menschen eine Steigerung der Aktivität der alkalischen Phosphatasen für die Virushepatitis in den zentralen und peripheren Sinusoiden, für die chronisch aggressive Hepatitis entlang der sprossenden Bindegewebsstrukturen und in den Sinusoiden und für die Leberzirrhose in den Canaliculi mit sehr großer Regelmäßigkeit und Häufigkeit erwiesen. In der Leber der Wistar-Ratte dagegen ist dieser wichtige Indikator eines aktiven Prozesses im Bindegewebe bei progredienten Erkrankungen (z.B. floride Leberzirrhose) nur im 3. Monat der Fütterung anhand der beschriebenen spinnenförmigen Aussprossung in den Winkeln der Sinusoide nachweisbar gewesen und etwas vermehrt noch bis zum 5. Monat. Im weiteren Verlauf ist im Vergleich zur menschlichen Pathologie der Leber ebenfalls eine erhebliche Diskrepanz der enzymhistotopographischen Befunde mit dem Erscheinungsbild in der HE- und Sudanfärbung zu registrieren. Wider Erwarten und im Gegensatz zum Menschen kam es nur zu einer unbedeutenden Steigerung der Aktivität der alkalischen Phosphatasen entlang der ceroidbeladenen Kollapszonen, wobei gegen

Ende der Fütterung (8. und 10. Monat) Herde an den Winkeln der Sinusoide nicht mehr auffielen, obwohl in den HE- und sudangefärbten Schnitten durchaus das Erscheinungsbild einer sog. pseudolobulären Umstrukturierung bestand.

Im Gegensatz zu GYÖRGY und GOLDBLATT (14), die anhand mit der gleichen Diät erzeugter Fett- und Zirrhoselebern serologische Veränderungen verfolgten und aufzeigten, daß die Befunde bei Ratten mit der menschlichen Leberpathologie in Beziehung gebracht werden können, kann dies aus rein morphologischen und enzymtopographischen Kriterien nicht bestätigt werden.

Abschließend läßt die vorliegende Versuchsreihe annehmen, daß selbst unter gleichen Fütterungsbedingungen verschiedene Rattenrassen unterschiedlich in ihrem morphologischen Bild auf eine allein durch Diät hervorgerufene Belastung reagieren. Kritisch und mit Zurückhaltung zu bewerten sind daher tierexperimentelle Befunde, die selbst bei der gleichen Rasse Versuchsergebnisse von einem Stamm auf den anderen übertragen. Analogieschlüsse von tierexperimentellen Untersuchungen auf den Menschen sollten besser nicht in Beziehung gesetzt werden. Die Hinzunahme enzymhistotopographischer Parameter stellte eine Erweiterung des diagnostischen Spektrums auch auf diesem Teilgebiet der Leberforschung dar.

E. Zusammenfassung

Es wurde ein kurzer Überblick über bisher bekannte Enzyminduktionen und empirische Enzymdiagnostik mit den alkalischen Phosphatasen bei Leberkrankheiten des Menschen sowie Enzymreaktionen bei experimentell erzeugten Leberzellschädigungen an der Rattenleber gebracht.

Durch Verfütterung einer Diät bei Wistar-Ratten wurde allein durch die Zusammensetzung der Diät ohne Zusatz von schädigenden Noxen bei 70 erwachsenen männlichen und weiblichen Wistar-Ratten über eine Fettleber eine sogen. Leberzirrhose erzeugt.

Im Verlaufe einer Diätstudie über 10 Monate wurde anhand histologischer und enzymhistotopographischer Darstellung an der Rattenleber nachgewiesen, daß zwischen Rattenleber und Leber des Menschen keine Funktionsgleichheit besteht, wobei im besonderen auf Vergleichsuntersuchungen mit der Aktivität der alkalischen Phosphatase an der menschlichen Leber Bezug genommen wurde.

F. Literaturverzeichnis

1. AHLQUIST, J.: Liver Mast Cell Counts during Development of Cirrhosis of the Liver in Rats on a low Protein high fast Diet.
Acta Pathologica u. Microbiologica Scan. Suppl. 50, (1960), 142
2. BIANCHI-BOSISIO RIGHETTI, A.: Mechanism of Elevation of Alkaline Phosphatase and 5-Nucleotidase in Liver Obstruction.
European Ass. for the Study of the Liver, Nr. 25, (1970)
3. CLEVELAND, F.P., RICHFIELD, D.F., GALL, E.A., SCHIFF, L.: Observations on the Distribution of Alkaline Phosphatase and its diagnostic Significance.
Arch. Path. 49, (1950), 333
4. HARTROFT, W.S.: Accumulation of Fat in Liver Cells and Lipodiastemata Preceding Experimental Dietary Cirrhosis.
Anat. Rec. 61, (1950), 106
5. HOGEBOOM, H.G., SCHNEIDER, W.C. and STRIEBICH, M.J.: Localization and Integration of cellular Fraction.
Cancer Res. 13, (1953), 617
6. GYÖRGY, P. and GOLDBLATT, H.: Further Observations on the Production and Prevention of dietary hepatic Injury in Rats.
J. Exptl. Med. 89, (1949), 245 - 268
7. GYÖRGY, P.: Zur Frage der experimentellen Leberschädigung.
Med. 16, (1952), 515 - 519
8. HOFFBAUER, F.W.: Fatty Cirrhosis in Rat.
Arch. Path. 68, (1959), 160
9. KAUTZSCH, E.: Die histochemisch darstellbare alkalische Leberphosphatase und ihr Verhalten bei der Hepatitis epidemica.
Med. Klinik 59, (1964), 1501 - 1505
- KAUTZSCH, E.: Activity and Localization of some Enzymes in Cirrhosis of Liver.
3rd Int. Cong. Gastroenterolog. Tokyo (1966)

11. KAUTZSCH, E.: Zum histotopographischen Verhalten der sauren Phosphatase in der Leber. Ikterus, Int. Symp. Freiburg, Schattauer Verlag, Stuttgart - New York (1967)
12. NOVIKOFF, A.B.: The Validity of histochemical Phosphatase Methods on the Intracellular Level. Science 113, (1951), 320
13. PAPENBERG, J., LINHART, R.: Zum Äthanolstoffwechsel der isoliert durchströmten Cirrhoseleber der Ratte. Verhandl. der Dtsch. Ges. für Inn. Med. 76, (1970)
14. PAPENBERG, J., LINHART, P., WAGENER, H.: Biochem. Veränderungen im Blutplasma und im Lebergewebe bei der experimentell erzeugten Lebercirrhose bei der Ratte. Dtsch. Gesell. f. Inn. Med., 76. Kongreß, Bergmann Verlag (1970)
15. PEARSE, A.G.E.: Alkaline Phosphatases. Histochemistry Second Edition (1961) London J & A. Churchill 384 - 430
16. POPPER, H., KOCH-WESER, P. and de la HUERGA, J.: Serum and hepatic Enzymes in experimental Liver Damage. J.Mt. Sinai Hosp. 19, (1952), 256
17. POPPER, H., de la HUERGA, J. and KOCH-WESER, D.: Fate of choline in Rats with and without experimental hepatic Injury. Ann. New York Acad. Sc. 57, (1954), 936
18. ROSENBERG, J.N.: Zone electrophoretic Studies of serum alkaline Phosphatase. J. clin. Invest. 38, (1959), 630
19. RUBARTH, S.: Leber und Gallenwege. Pathologie der Laboratoriumstiere, Springer Verlag, I. Band (1958), 155 - 175
20. TASAKA, S., ISHII, K.: Hepatic Enzymes in Liver Diseases. Progress in Liver Diseases Vol. I., (1961), 229

21. WACHSTEIN, M., ZAK, F.G.: Distribution of alkaline Phosphatase in the Human Liver. Arch. Path. 42, (1946), 501
22. WACHSTEIN, M. and MEISEL, E.: Enzymatic Histochemistry of Ethionine induced Livercirrhosis and Hepatoma. J. Histochem. & Cytochem. 7, (1959), 189
23. WACHSTEIN, M., MEISEL, E. and FALCON, G.: Enzymatic Histochemistry in the experimentally damaged Liver. Ann. J. Patholog. 40, (1963), 219 - 242

L e b e n s l a u f

Am 18. Januar 1938 wurde ich als Tochter des Bauunternehmers Karl Landauer und seiner Ehefrau Maria, geb. Leibbrandt, in München geboren.

Von 1944 bis 1948 besuchte ich die Volksschule in Mönchsroth, Tutzing und München an der Boschetsriederstraße, von 1948 bis zur Reifeprüfung im Juli 1957 das Mädchenrealgymnasium München-Süd.

Von 1957 bis 1963 studierte ich an der Universität München Medizin und beendete das Studium mit der ärztlichen Prüfung am 26. September 1963.

Vom 1. Oktober 1963 bis 31. Dezember 1965 war ich als Medizinalassistentin in München und Berlin tätig. Am 31. Dezember 1965 erhielt ich die Bestallung als Ärztin.

Vom 1. Januar 1966 bis 31. März 1966 war ich als Assistenzärztin an der gynäkologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München r.d.Isar tätig, vom 1. Juli 1966 bis 31. September 1968 als Assistenzärztin an der chirurgischen Abteilung der Kinderklinik München an der Lachnerstraße, seit 1. Februar 1969 bin ich als Assistenzärztin an der medizinischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München Oberföhring tätig.

Nunmehr bewerbe ich mich erstmalig um den Doktorgrad der Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität zu München.

